

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開2000-262281

(P2000-262281A)

(43) 公開日 平成12年9月26日 (2000.9.26)

(51) Int.Cl.<sup>7</sup>

識別記号

F I

ターム (参考)

C 1 2 N 9/04

C 1 2 N 9/04

D 4 B 0 5 0

C 1 2 Q 1/00

C 1 2 Q 1/00

B 4 B 0 6 3

// C 1 2 Q 1/54

C 1 2 Q 1/54

(C 1 2 N 9/04

C 1 2 R 1:01)

審査請求 未請求 請求項の数 4 O L (全 6 頁)

(21) 出願番号

特願平11-74219

(22) 出願日

平成11年3月18日 (1999.3.18)

(71) 出願人 596153357

早出 広司

東京都目黒区南 1-13-16

(72) 発明者 早出 広司

東京都目黒区南 1-13-16

(74) 代理人 100089705

弁理士 社本 一夫 (外 5 名)

F ターム (参考) 4B050 CC10 DD02 FF03E FF05E

FF09E FF10E GG08 LL03

LL05

4B063 QA01 QQ03 QQ15 QQ16 QQ67

QR04 QR51 QR65 QR82 QS39

QX04

(54) 【発明の名称】 架橋グルコースデヒドロゲナーゼ

(57) 【要約】

【課題】 本発明は、グルコースデヒドロゲナーゼの熱安定性を高めることを目的とする。

【解決手段】 二官能性試薬により架橋された水溶性 PQQGDH。

## 【特許請求の範囲】

【請求項1】 二官能性試薬により架橋された水溶性PQQGDH。

【請求項2】 前記PQQGDHが、*Acinetobacter calcoaceticus*由来である、請求項1記載の水溶性PQQGDH。

【請求項3】 前記二官能性試薬がグルタルアルデヒドである、請求項1または2記載の水溶性PQQGDH

【請求項4】 電極上に請求項1-3のいずれかに記載の水溶性PQQGDHを固定化してなるグルコースセンサー。

## 【発明の詳細な説明】

## 【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、熱安定性を高めるように改良されたグルコースデヒドロゲナーゼに関する。

## 【0002】

【従来の技術】糖尿病患者は年々増加する傾向にあり、糖尿病の診断や、患者の在宅管理が非常に重要であるため、血糖値を簡便かつ迅速に測定しうるグルコースセンサーが開発されている。グルコースセンサー素子としては、グルコースオキシダーゼ(GOD)が最もよく用いられている。GODは、熱に安定であり、安価に大量に供給される酵素であるため、頻繁に用いられてきた。GODのグルコースの検出原理としては、GODのグルコースの酸化反応の際に消費される酸素を検出する酸素電極型または生成される過酸化水素を検出する過酸化水素電極型が開発された。しかしこの方法では高い印加電位のため、血液中の他の酸化還元物質に影響を受けてしまうため、1980年代からは様々な電子メディエーターを用いて、印加電位をさげるメディエーター型のセンサーが開発されてきている。しかしGODは、溶存酸素濃度が高くなると電子をメディエーターではなく酸素にも渡してしまうため、正確な測定ができない。そこで、溶存酸素濃度に影響されないメディエーター型の理想的なセンサー素子としてグルコース脱水素酵素(GDH)が注目されるようになった。GDHのなかでも、補酵素結合型のPQQグルコース脱水素酵素(PQQGDH)は、触媒活性が高く、ターンオーバー数が高いため、応答電流値が高く、応答時間もはやい。つまり、正確で迅速な測定が可能である。また、補酵素結合型であるため反応溶液中に高価な補酵素を添加する必要がない。さらに、酵素が水溶性であれば緩衝溶液中に界面活性剤が不要であり、取り扱いが容易であるという利点があるため、*Acinetobacter calcoaceticus*由来の水溶性PQQGDH(PQQGDH-B)はグルコースセンサーの素子として非常に理想的である。

## 【0003】

【発明が解決しようとする課題】しかしながら、PQQ

GDHは、GODと比べてダイナミックレンジが狭く、基質特異性および安定性が低いため、実用可能なPQQGDHセンサーを開発するためには、これらの点で酵素を改良する必要がある。

【0004】従って、本発明は熱安定性の向上したPQQGDH-Bを提供することを目的とする。

## 【0005】

【課題を解決する手段】本発明は、二官能性試薬により架橋された水溶性PQQGDHを提供する。本発明の架橋型PQQGDHは、天然の水溶性PQQGDHと比較して高い熱安定性を有する。好ましくは、本発明のPQQGDHは、*Acinetobacter calcoaceticus*由来水溶性PQQGDHである。また、好ましくは、二官能性試薬はグルタルアルデヒドである。

【0006】本発明はまた、本発明に従う架橋型水溶性PQQGDHを用いるグルコースセンサーを提供する。

## 【0007】

【発明の実施の形態】架橋

本発明は、二官能性試薬により架橋された水溶性PQQGDHを特徴とする。本明細書において用いる場合、「二官能性試薬」とは、2つの反応性官能基を有する化学種を表す。本発明において用いることができる二官能性試薬としては、例えば、グルタルアルデヒドおよびグリオキサールが挙げられる。

【0008】酵素を高分子等の担体に固定化するために二官能性試薬を用いることはよく知られている。この場合、酵素のコンフォメーションを維持してその活性を保持させるためには、酵素それ自体の分子内架橋を回避すべきであると一般に考えられてきた。したがって、酵素を分子内架橋することによりその安定性が向上したことは驚くべき発見であった。

【0009】二官能性試薬による架橋は、酵素を適当な溶媒に溶解し、二官能性試薬を加えて室温またはそれ以下の温度で反応させた後に、未反応試薬を除去することにより行うことができる。反応は、酵素濃度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ – $100\mu\text{g}/\text{ml}$ の範囲で行うことが好ましい。濃度が $1\mu\text{g}/\text{ml}$ より低いと反応速度が著しく低く実用的ではない。また、酵素濃度が $100\mu\text{g}/\text{ml}$ より高いと酵素の適正なコンフォメーションが維持されないために酵素活性が低下する。さらに濃度が高くなると、分子間架橋が生じ、酵素蛋白質が凝集して酵素活性が著しく低下すると予測される。酵素濃度が $50\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下であることが最も好ましい。また、二官能性試薬の終濃度は、好ましくは0.01–5%、より好ましくは0.1–2.5%である。さらに、未反応の二官能性試薬が溶液中に残存していると、酵素活性が低下するおそれがあるため、透析、カラムクロマトグラフィー等の方法により、未反応の二官能性試薬を除去することが好ましい。

### グルコースセンサー

本発明はまた、電極上に本発明に従う架橋PQQGDHを固定化してなるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、金電極、白金電極、カーボンペースト電極、グラッシーカーボン電極、グラファイト電極などを用いることができる。この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、導電性ポリマーに吸着させる方法などがあり、これらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の架橋型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、本発明の架橋型PQQGDHを担体蛋白質と混合した後、グルタルアルデヒドで処理することによりカーボン電極上に固定化する。好ましくは、次にアミン基を有する試薬で処理してグルタルアルデヒドをブロッキングする。これは、酵素の架橋処理により、固定化に必要な遊離基の数が不十分となるため、担体蛋白質の網目を形成させることによって酵素の漏れを防ぐことができると考えられるからである。担体蛋白質としては、PQQGDHの酵素活性に悪影響を与えない限り、任意の蛋白質、例えばウシ血清アルブミンを用いることができる。

【0010】グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルにPQQおよびCaCl<sub>2</sub>を、ならびにメディエーターを含む緩衝液を入れ、一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェロセン、オスミウム誘導体、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化したカーボンペースト電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボンペースト電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

### 【0011】

【実施例】以下の実施例においては、次の試薬および装置を用いた。基質ピロキノリンキノン（PQQ）は三菱瓦斯化学（株）から購入した。架橋処理にはグルタルアルデヒド25%水溶液（一級）（キシダ化学（株））を用いた。電極の作製には、カーボンペースト電極（内径3.0mm、外径6.0mm）およびカーボンペーストオイルベース（いずれもBAS社）を用いた。

### 実施例1

#### 酵素の調製

PQQGDH-Bの生産には、プラスミドベクターpTrc99A（ファルマシア社）のNcoI-HindIII部位にPQQGDH-Bをコードする遺伝子1.5

kbを挿入して構築したプラスミドpGB2（図1）を、PQQGDHの生産能を欠く大腸菌PP2418株に導入して得た形質転換体を用いた。大腸菌を2リットルのファーマンターで常法により培養し、IPTGで誘導した。集菌、洗浄した菌体を10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で懸濁し、フレンチプレスで破碎した後、遠心分離（10000gで20分間、4℃）を2回繰り返し未破碎菌体を除去した。これの上清を超遠心分離（50000r.p.m.、60分間、4℃）し、その上清を水溶性画分として得た。これを、100倍量の10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で1晩透析した。

【0012】透析後の粗精製酵素を、0.2μmのフィルターで濾過し、同じくフィルターで濾過した、10mMリン酸緩衝液（pH7.0）をAバッファー、0.8M NaCl 10mMリン酸緩衝液（pH7.0）をBバッファーとして、Aバッファーで平衡化した陽イオン交換カラムクロマトグラフィー用充填カラム、CMT OY OPEARL 650Mカラムを用いて、Bバッファー40%/60分のグラジエントによりPQQGDH-Bを溶出させた。流速は3ml/minで行った。蛋白質の検出には280nmの吸光度を用い、ピークの部分を分取した。

【0013】次に、分取したサンプルを、0.2M NaCl、10mMリン酸緩衝液（pH7.0）で平衡化したヒドロキシアパタイトカラムに負荷し、0.2M-0.5M NaCl、10mMリン酸緩衝液（pH7.0）/60分のグラジエントによりPQQGDH-Bを溶出させた。溶出は1ml/minで行い、2分ごとに溶出液を回収した。得られた活性画分を100倍量の10mM MOPS緩衝液（pH7.0）で透析し、脱塩を行った。

### 実施例2

#### PQQGDH-Bの酵素活性測定方法

PQQGDH-Bの酵素活性測定は、10mMリン酸緩衝液pH7.0中においてPMS（フェナジンメトサルフェート）-DCIP（2,6-ジクロロフェノールインドフェノール）を用いておこなった。DCIPの600nmの吸光度変化を追跡し、その吸光度の減少速度を酵素の反応速度とした。このとき、1分間に1μmolのDCIPが還元される酵素活性を1ユニットとした。また、DCIPのpH7.0におけるモル吸光係数は16.3mM<sup>-1</sup>とした。測定には分光光度計UV-1200（島津製作所製）を用いた。

### 実施例3

#### 架橋型酵素の調製

実施例1で調製した酵素を、1mM PQQ、1mM CaCl<sub>2</sub>の存在下で、30分間室温でインキュベートしホロ化した。ホロ化した酵素に、終濃度0.1、1.0、2.5%となるようにGAを加え、30分間室温で攪拌した。未架橋対照としてGAのかわりに水を用いて

架橋処理と同様の処理を行った。これを1000倍量の10mM MOPS緩衝液(pH7.0)で透析、またはNAP-10カラムを用いて未反応のGAを除去した。これらの酵素の活性を上述の方法にしたがって測定した。

【0014】結果を図2に示す。架橋処理前の酵素の活性を100%とすると、0.1%GAを用いて架橋処理をした場合、約28%の活性が維持された。高い濃度のGAで処理した場合には、活性はより低下した。対照として水を用いて処理した場合には、活性は約12%に低下した。

#### 実施例4

##### 熱安定性の評価

実施例1で調製した酵素を、架橋時の蛋白質濃度をそれぞれ99.09、49.55、39.64、33.03  $\mu\text{g}/\text{ml}$ として、実施例3にしたがって、0.1%GAで架橋処理した。次に、架橋処理酵素を蛋白質濃度1.0  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調製し、55°Cで0~40分間インキュベートすることにより熱処理し、酵素の残存活性を測定した。未架橋対照としてGAのかわりに水を用いて架橋処理と同様の処理を行った。

【0015】結果を図3に示す。架橋時の酵素濃度が約50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 以下の場合、GA架橋により熱安定性が顕著に向上することがわかった。酵素濃度が高い場合には、分子間架橋が生ずるために活性が低下すると考えられる。

#### 実施例5

##### ブロッキング

GA処理後の遊離アルデヒド基をブロッキングし、その影響を調べた。実施例1にしたがってホロ化した酵素に、グルタルアルデヒド(GA)溶液を0.1%になるように加え、30分間室温で攪拌した(架橋時の蛋白質濃度は約27  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。GAの代わりに精製水を加え、同様の処理をおこなったものを未架橋対照とした。これを、(1)1000倍量の10mM MOPS緩衝液(pH7.0)で透析、(2)10mM Tris-HCl緩衝液(pH7.0)で透析、(3)終濃度50mMリジンとして20分間室温で攪拌したのち、10mM MOPS緩衝液(pH7.0)で透析という3種類の処理を行い、凍結乾燥させ、水で再溶解した。これらの架橋酵素を55°Cで0~40分間熱処理し、残存活性を測定した。

【0016】結果を図4に示した。ブロッキングをすることによりさらに熱安定性が向上している。

#### 実施例6

##### 架橋型酵素のキャラクタリゼーション

実施例2で得られた最適条件で架橋した酵素について、グルコース濃度0~100mMの範囲でその活性を測定した。結果を図5に示す。本発明の架橋型酵素のグルコースに対する $V_{\text{max}}$ は388U/mgであり、 $K_m$ は

20mMであった。

#### 実施例7

##### 架橋型PQQGDHを用いた酵素センサーの作製

実施例1で調製した酵素サンプルを、1mM PQQ、1mM  $\text{CaCl}_2$ 存在下で、30分間室温でインキュベートしホロ化した。これを蛋白質濃度30  $\mu\text{g}/\text{ml}$ に調整し、終濃度0.1%となるようGAを加えて30分間室温で攪拌した後、1000倍量の10mM MOPSで透析した。この酵素5Uにカーボンペースト20mgを加え、1晩凍結乾燥した。これをよく混合した後、すでにカーボンペーストが約40mg充填されたカーボンペースト電極の表面だけに充填し、汚紙上で研磨した。電極表面に1mg/mlのウシ血清アルブミン5  $\mu\text{l}$ を滴加し、室温で乾燥させた。この電極を1%のGAを含む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で、30分間室温で処理したのち、20mMリジンを含む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で、20分間室温で攪拌し、GAをブロッキングした。

【0017】次に、この電極を10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で1時間以上室温で攪拌し、平衡化した。測定時以外は1mM PQQ、1mM  $\text{CaCl}_2$ を含む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)中で、4°Cで保存した。

【0018】恒温セルに1mM PQQ、1mM  $\text{CaCl}_2$ を含む10mM MOPS緩衝液(pH7.0)を入れ、メディエーターとして、終濃度1mM m-PMsを加え、総量を10mlとした。そこに作用電極として作製したカーボンペースト電極を用い、対極として白金電極、参照極としてAg/AgCl電極を用いた。測定は全て25°Cで行った。+100mVの電位を印加し、電流が定常になったところで、適当な濃度のグルコースを加えて、増加した電流値を計測した。グルコースを加えていないときの電流値を0Aとした。

【0019】キャリブレーションカーブを図6に示す。本発明の架橋型酵素を用いたグルコースセンサーにより、1mM~12mMの範囲でグルコースの測定が可能であった。

##### 【図面の簡単な説明】

【図1】 図1は、プラスミドpGB2の構造を示す。

【図2】 図2は、グルタルアルデヒドにより酵素を処理した後の残存活性を示す。

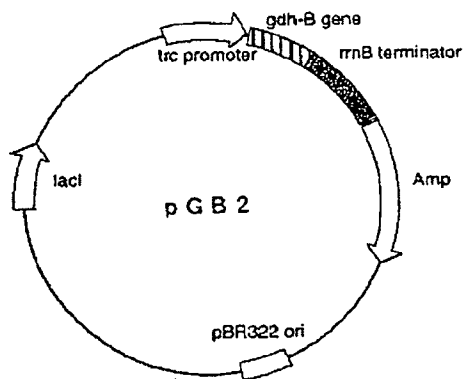
【図3】 図3は、本発明の架橋型酵素の熱安定性を示す。

【図4】 図4は、グルタルアルデヒド処理後のブロッキングの影響を示す。

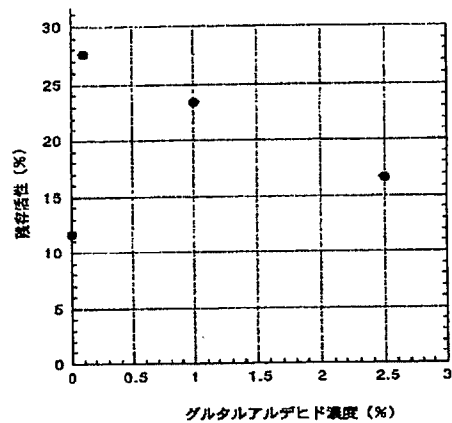
【図5】 図5は、種々のグルコース濃度における本発明の架橋型酵素の活性を示す。

【図6】 図6は、本発明の架橋型酵素を用いる酵素センサーのキャリブレーションカーブを示す。

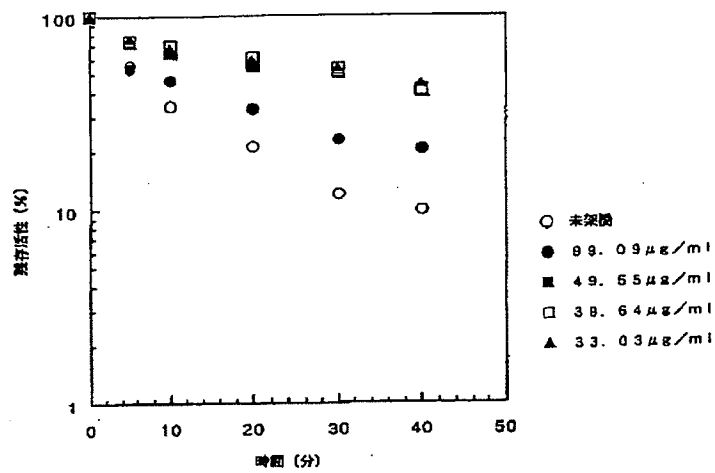
【図1】



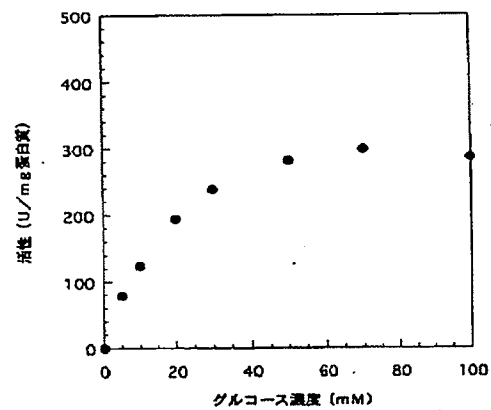
【図2】



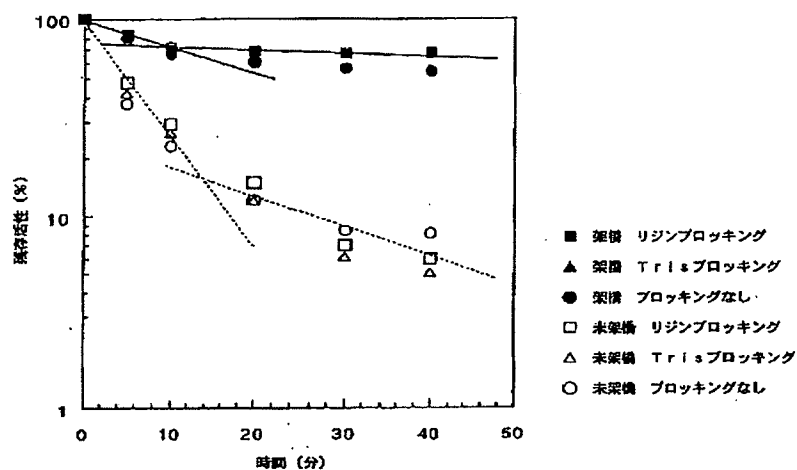
【図3】



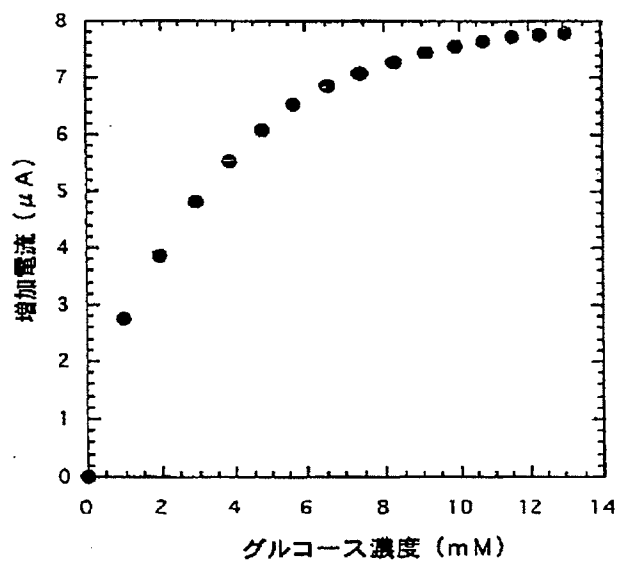
【図5】



【図4】



【図6】



## PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-262281

(43)Date of publication of application : 26.09.2000

(51)Int.Cl.

C12N 9/04  
C12Q 1/00  
// C12Q 1/54  
(C12N 9/04  
C12R 1:01 )

(21)Application number : 11-074219

(71)Applicant : HAYADE KOJI

(22)Date of filing : 18.03.1999

(72)Inventor : HAYADE KOJI

## (54) CROSSLINKED GLUCOSE DEHYDROGENASE

## (57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To obtain the subject new enzyme for glucose sensors, etc., comprising PQQ glucose dehydrogenase crosslinked by a bifunctional reagent, having high heat stability and capable of simply and rapidly measuring blood glucose level useful for diagnose, etc., of diabetes mellitus.

SOLUTION: This enzyme is a new water-soluble PQQ glucose dehydrogenase (PQQGDH) crosslinked by a bifunctional reagent and is improved so as to increase heat stability and useful for glucose sensor elements, etc., capable of simply and rapidly measuring blood glucose level which is important for diagnosis of diabetes mellitus, home control, etc., of patients. The enzyme is obtained by incubating a glucose dehydrogenase derived from *Acinetobacter calcoaceticus* in the presence of 1 mM pyrroloquinolinequinone(PQQ) and 1 mM CaCl<sub>2</sub> at room temperature for 30 min and adding a bifunctional reagent thereto and stirring these components at room temperature for 30 min to carry out crosslinking reaction.

## LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office